
PROBIOOTTEJA SISÄLTÄVÄN PIIMÄN VALMISTAMINEN JA SÄILYVYYDEN SEURANTA



Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö

Bio- ja elintarviketekniikka

Visamäki, 10.11.2010

Pekka Korkee



Bio- ja elintarviketekniikka
Visamäki

Työn nimi Probiootteja sisältävän piimän valmistaminen ja säilyvyyden seuranta

Tekijä Pekka Korkee

Ohjaava opettaja Riitta Manninen, Tuija Pirttijärvi

Hyväksytty _____._____.20____

Hyväksyjä

VISAMÄKI

Bio- ja elintarviketekniikka

Meijeritekniikka

Tekijä

Pekka Korkee

Vuosi 2010

Työn nimi

Probiootteja sisältävän piimän valmistaminen ja säilyvyyden seuranta

TIIVISTELMÄ

Tässä opinnäytetyön kokeellisessa osiossa valmistettiin viisi erilaisen koostumuksen omaavaa piimää. Piimät valmistettiin Hämeen ammattikorkeakoulun Sairion kampuksen opetusmeijerissä. Piimien valmistuksessa käytettiin uudentyyppisiä patentoituja probiootteja. Myös prebioottilisäystä sekä erilaisia probioottikantojen siirrostusmuotoja ja -tapoja piimiin kokeiltiin. Lisäksi apuhapatteen vaikutusta yhdessä probioottien kanssa tutkittiin. Piimäerät valmistettiin 12 litran erissä ja ne pakattiin 2 dl:n pika-reihin. Tuotteiden säilyvyyttä tutkittiin kolmen viikon kylmäsäilytyksen aikana kerran viikossa mikrobiologisin, kemiallisin ja aistinvaraisin menetelmin. Viidestä piimästä valittiin paras jatkokehitystä varten.

Testatuista piimäeristä aistinvaraisesti parhaaksi osoittautui tuote P3, jonka valmistuksessa käytettiin kolmea esikasvatettua probioottikantaa ja kaupallista hapatetta. Parhaaksi tuotteeksi jatkokehitystä varten valittiin kuitenkin tuote P2b, joka valmistettiin ilman kaupallista hapatetta ja jossa probioottikannat siirrostettiin pakasteena suoraan piimämaitoon ilman esikasvatusta.

Probiootit pystyivät kasvamaan kaikissa piimäerissä ja piimäerät säilyivät aistinvaraisesti arvioiden hyvin kolmen viikon seurannan ajan. Mikrobiologinen säilyvyys ei ole yksiselitteinen, koska probioottikannoissa todettiin enterobakteerikontaminaatio, joka siirtyi osaan piimäeristä. Prebioottilisäys piimämaitoon tuotti näissä tutkimuksissa aistinvaraisesti heikon tuotteen.

Avainsanat Piimä, hapanmaitovalmisteet, probiootit, prebiootit

Sivut 26 s. + liitteet 7 s.

VISAMÄKI

Degree Programme in Biotechnology and Food Engineering

Dairy Technology

Author

Pekka Korkee

Year 2010

Subject of Bachelor's thesis

Production and shelf-life of probiotic sour milk

ABSTRACT

The purpose of this project was to examine the production and shelf-life of probiotic sour milk. In order to do this five batches of probiotic sour milk with different consistency were manufactured in Sairio campus dairy plant at HAMK University of Applied Sciences. New types of patented probiotic bacteria were used in the manufacture of sour milks. Different probiotic inoculation methods were also tested. In addition, the interaction of a commercial starter, probiotics and prebiotics were tested. Sour milks were manufactured in batches of 12 litres and they were packed in 2 dl plastic cups. During three weeks of cold storage the preservability of the test products was examined once a week using microbial, chemical and sensory methods. The best product was chosen for further development.

Out of the tested probiotic sour milk batches the best product in sensory evaluation was proved to be product P3 that was made with three probiotic strains and a commercial starter. The best product chosen for further development was, however product P2b that was made with only a frozen probiotic inoculum that was added straight to the milk without the addition of commercial starter.

The results of the study showed that probiotic bacteria were able to grow and survive in most of the sour milk batches and the products preserved quite well during the three weeks monitoring according to sensory evaluation. Microbial preservability was not so unambiguous because some of the probiotic strains were contaminated with enterobacteria that infected some of the test products. The addition of prebiotics produced a weak sensorial quality to the sour milk in this study.

Keywords Sour milk, fermented milk products, probiotics, prebiotics

Pages 26 p. + appendices 7 p.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	1
2	PIIMÄ.....	2
2.1	Markkinoilla olevia piimiä.....	2
2.2	Maitoraaka-aineen vaatimukset.....	2
2.3	Hapatteen merkitys.....	2
3	PIIMÄN TEOLLINEN VALMISTUS.....	4
3.1	Maidon esivalmistelut.....	4
3.2	Maidon siirrostus hapatteella.....	5
3.3	Säilyvyys.....	6
3.4	Piimän aistinvaraiset ominaisuudet.....	7
4	PROBIOOTTIEN TEKNOLOGISIA SOVELLUKSIA.....	9
4.1	Probiootit.....	9
4.2	Kaupalliset probioottiviljelmät.....	9
4.3	Käytettävien probioottikantojen vaatimukset ja valintaperusteet.....	9
4.4	Probioottien käyttö yksin ja yhdessä apuhapatteen kanssa.....	10
4.5	Probiootin elinkykyisyys.....	11
4.6	Prebiootit.....	12
5	TESTIPIIMIEN VALMISTUS, LAADUNVALVONTA JA SÄILYVYYDEN SEURANTA.....	13
5.1	Työn tarkoitus.....	13
5.2	Materiaalit ja menetelmät.....	13
5.2.1	Bakteerikannat.....	13
5.2.2	Raakamaito.....	13
5.2.3	Testipiimien koostumus.....	13
5.2.4	Probioottien esikasvatus.....	15
5.2.5	Testituotteiden valmistus, pakkaus ja varastointi.....	15
5.2.6	Mikrobiologiset määritykset.....	17
5.2.7	Aistinvaraiset analyysit ja pH mittaus.....	18
6	TULOKSET JA TULOSTEN ARVIOINTI.....	19
6.1	Testipiimien aistinvarainen laatu ja happamuus.....	19
6.2	Testipiimien mikrobiologinen laatu.....	20
6.2.1	Kokonaisbakteeripitoisuudet lämpökäsitellystä maidosta (PCA).....	20
6.2.2	Hiivat ja homeet (YGC).....	20
6.2.3	Enterobakteerit (VRBG).....	21
6.2.4	Kontaminantit (SF).....	21
6.3	Testituotteiden säilyvyys.....	22
6.4	Pohdinta.....	23
	LÄHTEET.....	24

LIITE 1	Esikasvatusmaitojen probioottipitoisuudet
LIITE 2	Testituotteet P1 Mikrobiologiset määrittystulokset
LIITE 3	Testituotteet P2a Mikrobiologiset määrittystulokset
LIITE 4	Testituotteet P2b Mikrobiologiset määrittystulokset
LIITE 5	Testituotteet P3 Mikrobiologiset määrittystulokset
LIITE 6	Testituotteet P4 Mikrobiologiset määrittystulokset
LIITE 7	Testituotteet P5 Mikrobiologiset määrittystulokset

1 JOHDANTO

Piimä on hyvä alusta terveyttä edistävien probioottien lisäämiselle ja hyödyntämiselle tuotteessa. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli valmistaa viisi koostumukseltaan erilaista piimää ja selvittää niiden aistinvarainen, kemiallinen (pH) ja mikrobiologinen laatu sekä seurata niiden säilyvyyttä kolmen viikon ajan. Valmistuksessa neljässä piimässä käytettiin kolmea eri probioottikantaa sekä kahdessa tuotteessa erään prebiootin lisäystä. Lisäksi valmistettiin yksi erä perinteistä piimää tuotteiden vertailua varten.

2 PIIMÄ

Piimä on erityisesti Skandinaviassa suosittu, maitohappokäymisen avulla valmistettu perinteinen hapanmaitotuote. Piimän, kuten muidenkin hapanmaitotuotteiden kulutuksen suosiota selittää se, että perinteisistä tuotteista on pystytty onnistuneesti kehittämään monenlaisia eri muunnoksia. (Fonden, Leporanta & Svensson 2006, 156 – 157.)

2.1 Markkinoilla olevia piimiä

Piimää käytetään kotitalouksissa ruoka- ja janojuomana sekä leipomoteollisuudessa ja kotileivonnassa leivonnaisten nesteinä. Piimien valmistuksessa maitoon lisätään hapatetta, joka saostaa maidon. Rasvapitoisuus vaihtelee piimästä riippuen 0 – 2,5 % välillä. (Manninen 2005, 32.) Tiettyihin piimiin lisätään myös yhtä tai useampaa probioottista maitohappobakteeria. Probiootteja voidaan käyttää piimän hapattamiseen tavallisen piimähapanteen asemesta tai piimähapanteen lisänä (Silfverberg 2007, 107). Piimävalikoimaa on saatavilla vähälaktoosisena, laktoosittomana ja luonnonmukaisesti tuotettuna. Probioottisia maitohappobakteereja sisältävät piimät, kuten Valion Gefilus-piimä (*Lactobacillus rhamnosus*) ja Arla-Ingmanin RELA-piimä (*Lactobacillus reuteri*) ovat esimerkkejä probiootteja sisältävistä piimistä. (Valio piimät, 2010; Arla Ingman maidot/piimät, 2010.) Vuonna 2009 Suomessa piimää kulutettiin 12,6 litraa henkilöä kohden (Matilda maataloustilastot, 2009).

2.2 Maitoraaka-aineen vaatimukset

Hapanmaitotuotteita valmistettaessa raakamaidon mikrobiologisen ja kemiallisen laadun lähtötaso on oltava hyvä ja vaatimukset täyttävä. Maito on analysoitava tarkoin tuotantolaitoksella mahdollisten laatuvirheiden takia. Raaka-aineen on oltava peräisin terveistä eläimistä ja sen on syytä olla tuoretta. Bakteerien ja bakteriofagien sekä proteolyyttisten, lipolyyttisten ja itiöllisten mikrobien määrien on oltava alhaiset, koska ne saattavat estää tai heikentää hapatebakteerien toimintaa ja siten maitohappokäymistä. Hapatebakteerien kasvua häiritsevät myös antibiootti- ja pesuainejäämät jo varsin pieninä pitoisuuksina.

Maidon hyvän lähtötason varmistamisen lisäksi parhaat kasvuolosuhteet saavutetaan, kun piimämaidolle suoritetaan ennen siirrostusta riittävä lämpökäsittely (esimerkiksi 95 °C/30 minuuttia), jolloin merkittävä osa hapanteen kanssa kilpailevista mikrobeista kuolee. (Dairy Processing Handbook 2003, 258; Manninen 2005, 30.)

2.3 Hapanteen merkitys

Hapate on bakteeriviljelmä, joka oikeissa olosuhteissa maitoon lisättäessä käyttää laktoosia ja hapattaa sekä saostaa maidon. Hapate koostuu yhdestä tai useammasta maitohappobakteerikannasta, jotka yhdessä muodostavat

piimään maitohappoa ja aromiyhdisteitä. Piimän valmistuksessa käytetään perinteisesti mesofiilista DL-monikantahapatetta, joka sisältää neljää maitohappobakteerikantaa (taulukko 1). Sopivaa hapatetta valittaessa hapatebakteerikantojen kokoonpanolla ja suhteellisilla määrillä voidaan vaikuttaa ratkaisevasti lopputuotteen kemiallisiin ja aistinvaraisiin ominaisuuksiin. (Walstra, Geurts, Noomen, Jellema & van Boekel 1999, 347 – 349.)

Taulukko 1 Perinteisen piimähapатteen (DL-hapate) maitohappobakteerit (Ahonen 2007, 56)

Hapate- tyyppi	Hapatebakteerit	Tehtävä
D-hapate	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> tai <i>cremoris</i>	Maitohapon muodostus
	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	Aromiyhdisteen (diasetyylin) muodostus
L-hapate	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> tai <i>cremoris</i>	Maitohapon muodostus
	<i>Leuconostoc</i> -lajit/-kannat	Aromiyhdisteen muodostus

3 PIIMÄN TEOLLINEN VALMISTUS

3.1 Maidon esivalmistelut

Piimän valmistus alkaa raakamaidon esikäsitteilyllä, joihin kuuluvat kerma-
separointi, rasvapitoisuuden vakiointi, homogenointi ja lämpökäsittely. Raakamaidon separointi perustuu keskipakoisvoimalla toimivan separaattorin toimintaan (Manninen 2005, 24). Tehokkaalla separaattorilla kermää saadaan erotettua maidosta, siten että kuoritun maidon rasvapitoisuudeksi saadaan 0,05 % tai hieman alle (Dairy Processing Handbook 2003, 106). Ennen separointia maidosta voidaan poistaa ilmaa alipainekammiossa, mikä parantaa rakennetta vähentämällä lopputuotteen mahdollista heroittumista. (Dairy Processing Handbook 2003, 151)

Separoinnin jälkeisellä vakioinnilla tarkoitetaan maidon rasvapitoisuuden säätämistä halutuksi. Vakiointi voidaan suorittaa panostyyppisesti säiliössä sekoittamalla rasvattoman maidon joukkoon kermää tietyssä suhteessa. Isommissa tuotantolaitoksissa maidon rasvapitoisuus vakioidaan suoravakioinnin avulla, jolloin osa kermasta ja rasvattomasta maidosta yhdistetään linjassa välittömästi separoinnin jälkeen. Piimämaidon rasvapitoisuudeksi vakioidaan yleensä 0 – 2,5 %.

Vakioinnin jälkeen piimän valmistuksessa käytettävä maito voidaan tarvittaessa homogenoida. Homogenointi suoritetaan homogenisaattorilla, jonka yhteydessä on korkeapainepumppu. Korkeapainepumpun avulla maidon rasvapalloset pakotetaan suurella paineella (100 – 250 bar) homogenisaattorin homogenointipään ahtaan aukon läpi, jolloin rasvapalloset pilkkoutuvat pienemmiksi ja jakautuvat tasaisesti maitoon. Näin estetään rasvan nousu maidon pinnalle. (Dairy Processing Handbook 2003, 123 – 124) Lisäksi piimämaidon homogenointi parantaa piimän rakennetta ja stabiiliisuutta. Se vähentää heroittumista, hiutaleisuutta ja kokkareisuutta sekä lisää piimän viskositeettia. Samalla piimän kypsytykseen tarvittava aika lyhenee (Manninen 2005, 27–32).

Ennen homogenointia piimämaitoon voidaan lisätä D-vitamiinia. D-vitamiini on rasvaliukoinen, joten sitä poistuu aina separoinnin eli rasvan erotuksen seurauksena. Tarkoituksena on palauttaa erityisesti vähärasvaisten ja rasvattomien piimien D-vitamiinitaso täysmaitoa vastaavalle tasolle. (Manninen 2005, 25)

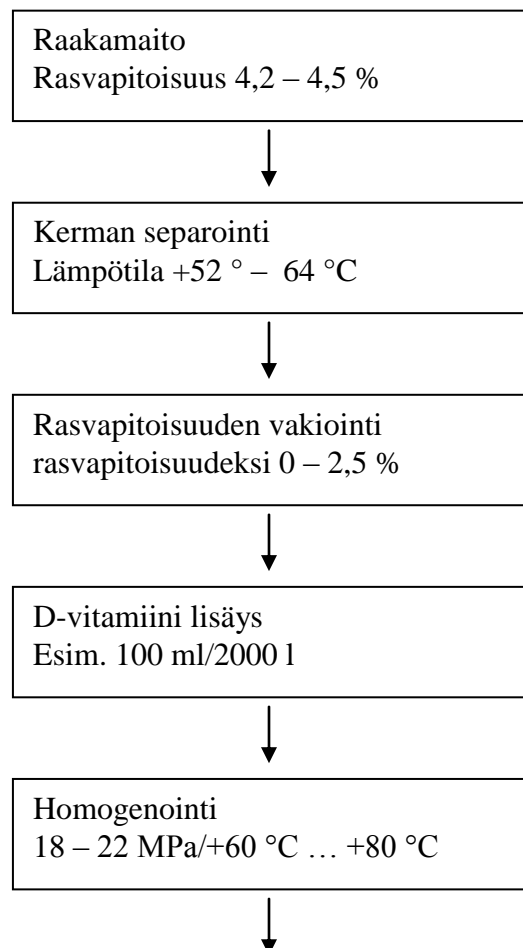
Homogenoinnin jälkeen maito lämpökäsitellään useimmiten levylämmönvaihdinta käyttäen. Hapanmaitotuotteiden valmistuksessa käytetään voimakasta lämpökäsittelyä – voimakkaampaa, kuin esimerkiksi tavallisten kauppamaitojen lämpökäsittelyä eli pastörintia. Tarkoituksena mikrobien tuhoamisen lisäksi on, että 70 – 80 % piimämaidon heraproteiineista on denaturoituneena, jolloin piimän konsistenssi paranee: piimään muodostuu paksu ja kiinteä rakenne. Myös vedensitomisoimaisuudet paranevat eli piimä ei heroitu niin herkästi. Sopiva lämpökäsittely piimämaidolle on esimerkiksi +90 °C...+95 °C/4 – 7 minuuttia. Liian voimakas lämpökäsit-

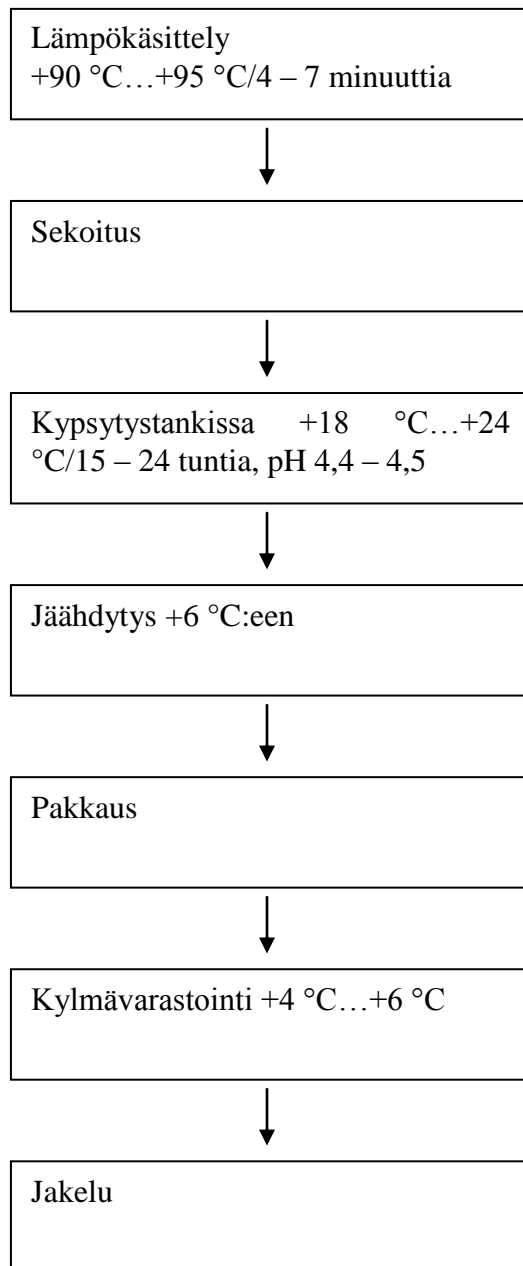
tely saattaa johtaa piimän heikentyneeseen rakenteeseen; piimässä esiintyy hiutaleita ja kokkareita sekä piimä heroittuu. (Manninen 2005, 32).

3.2 Maidon siirrostus hapatteella

Esikäsittelyvaiheiden jälkeen maito jäähdytetään levylämmönvaihtimen regenerointi- sekä jäähdytysosastossa siirrostus- ja kypsytyslämpötilaan, joka on piimällä +22 °C ja ohjataan sen jälkeen kypsytystankkeihin (Nilsson, Lyck & Tamime 2006, 109). Kypsytystankissa maitoon siirrostetaan hapatetta. Perinteinen tapa on valmistaa ensin käyttöhapate, jossa hapateviljelmää siirrostetaan ensin pieneen määrään lämpökäsiteltyä maitoa, jonka jälkeen hapatemaitoa kypsytetään yön yli, ja käytetään seuraavana päivänä varsinaisen piimämaidon hapattamisessa. Toinen yleinen tapa on käyttää kaupallisia konsentroituja pakkaskuivattuja rakeita, jotka siirrostetaan suoraan piimämaidon joukkoon (tuoteympäri).

Hapatteen lisäyksen jälkeen maidon annetaan hapattua kypsytystankissa +18 °C...+24 °C/15 – 24 tuntia (Silfverberg 2007, 107). Hapatuksen jälkeen piimän pH:n tulisi olla 4,4 – 4,6 (Manninen 2003, 33), jota seuraa piimän sekoittaminen ja jäähdyttäminen alle +8 °C:een (Silfverberg 2007, 107). Jäähdyttämisen tarkoituksena on pysäyttää maitohappokäyminen. Kypsytyksen ja jäähdytyksen jälkeen piimä pakataan ja varastoidaan kylmässä noin +4 °C:ssa. (Robinson & Tamime 2006, 7). Piimän valmistuksen vuokaavio on esitetty kuviossa 1.





Kuvio 1 Vuokaavio, piimän valmistuksen pääpiirteet (Manninen 2008, luentoaineisto)

3.3 Säilyvyys

Hapattaminen on yksinkertainen ja halpa tapa lisätä hapanmaitotuotteiden säilyvyysaikaa. Maitohappokäyminen vaikuttaa piimän laatuun ja säilyvyyteen siten, että useimmat haitalliset patogeenit eivät pysty kasvamaan tai jopa kuolevat happamien olosuhteiden vaikutuksesta. Piimän alhainen pH (4,0–4,6) auttaa myös vatsassa vallitsevan alhaisen pH tason säilyttämisessä. (Walstra, Geurts, Noomen, Jellema & van Boekel 1999, 517.) Toisaalta piimän happamat olosuhteet ovat suotuisia hiivojen ja homeiden kasvuun ja ne saattavat aiheuttaa piimään sivumakua ja -hajua sekä pilata tuotteen. (Dairy Processing Handbook 2003, 256–257.) Hiivat ja homeet

jatkavat kasvuaan vielä pH:n ollessa alle 3,8 ja ne ovat ylivoimaisesti tärkeimmät kontaminaation lähteet piimässä (Walstra, Geurts, Noomen, Jellema & van Boekel 1999, 517). Tästä syystä piimämaito on lämpökäsiteltävä ennen hapattamista. Samalla suurin osa patogeeneista kuolee. Lämpökäsittelyn avulla saadaan myös merkittävä osa hapatebakteerien kanssa kilpailevista mikro-organismeista tuhottua, jolloin hapatehäiriöiden riski pienenee. (Dairy Processing Handbook 2003, 250.)

Mikrobiologisen pilaantumisen lisäksi piimässä saattaa ilmetä myös kemiallista ja fysikaalista laadun heikkenemistä esimerkiksi heikkolaatuisten raaka-aineiden käytön tai valmistus- ja säilytysolosuhteiden seurauksena. Kemiallisia muutoksia saattaa syntyä tuotteen säilytyksen jatkuessa liian pitkään ja/tai säilytyslämpötilan ollessa liian korkea. Tällöin piimässä saattaa ilmetä jälkihappamoitumisesta aiheutuvaa kitkerää, hapokasta ja epätyypillistä makua ja hajua, jotka johtuvat hapatebakteerien entsyymien jatkuvasta toiminnasta ja siten liiallisesta hapon tuotosta piimään. Piimä tulisi säilyttää ja kuljettaa aina riittävän kylmässä lämpötilassa (alle +8 °C), jotta piimän pH ei pääsisi laskemaan liikaa, eikä jälkikontaminaatiota tapahtumaan. Lisäksi on huomioitava, että valo tai virheellinen pakkausmateriaali saattavat aiheuttaa piimään sivumakua. (Walstra ym. 1999, 517–518.)

Fysikaalinen laadun heikkeneminen näkyy usein tuotteen heroittumisena. Heroittumista lisääviä tekijöitä ovat:

- Maidon heikko laatu (alhainen kaseiinipitoisuus)
- Korkea inkubointi- eli kypsytyslämpötila (mitä korkeampi sitä suurempi alttius heroittumiselle)
- Alhainen tai liian korkea pH (hapatteen on oltava riittävän elinvoimainen ja tuote tulee säilyttää kylmässä)
- Mekaaninen käsittely siirrostuksen jälkeen (piimämaitoa ei tulisi sekoittaa tai pumpata varsinkaan ennen, kuin pH 5 on saavutettu)
- Ilman sekoittuminen piimämaitoon hapattamisen jälkeen (liiallista sekoittamista ja pumppauksia tulisi välttää)
- Kaasun muodostus (koliformiset mikrobit ja hiivat sekä hapatteen liiallinen CO₂ tuotto)

Maidon esikäsittelyt parantavat piimän laatua. Esikäsittelyvaiheista pastörointi ja homogenointi lisäävät maidon vedensitomiskykyä, jolloin viskositeetti kasvaa ja lopputuotteen heroittumisen riski pienenee. (Walstra ym. 1999, 518.)

3.4 Piimän aistinvaraiset ominaisuudet

Piimien aistinvarainen arviointi tehdään tuotteen ulkonäön, rakenteen sekä hajun ja maun suhteen. Piimän aistinvaraisen arvioinnin suorittaa raati ja tuotteen ominaisuudet pisteytetään asteikolla 1 – 5. Ulkonäön arvioinnissa katsotaan pakkauksen ulkonäkö, täyttö ja siisteys sekä päiväleima. Varsinaisesta piimästä arvioidaan tuotteen pinnan ulkonäkö, väri sekä pinta- ja pohjahera. Rakenteesta tutkitaan hiutaleet, kokkareet, ja ilmakuplat sekä tuotteen paksuus ja venyvyys. Piimän haju ja maku arvioidaan happamuu-

den ja aromikkuuden sekä mahdollisten virhemakujen mukaan. Ennen arviointia piimä temperoidaan $+12 \pm 2$ °C:een. (Evira 8005/1 2006, 27 – 28).

4 PROBIOOTTIEN TEKNOLOGISIA SOVELLUKSIA

4.1 Probiootit

Probiootit ovat terveyttä edistäviä mikrobeja, joita käytetään tavallisimmin meijeriteollisuudessa valmistetuissa funktionaalisissa elintarvikkeissa. Hyödynnetyt probioottikannat koostuvat pääasiassa laktobasilleista ja bifikakteereista. Probioottien on todettu muun muassa estävän haitallisten mikrobien kasvua ja tehostavan immuunivastetta (Palva, A. 2002, 601 – 605). Lisäksi niiden on todettu helpottavan laktoosi-intoleranssin oireita, ennalta ehkäisevän esimerkiksi virus ja bakteeriperäistä ripulia sekä mahdollisesti suolistosyöpiä. (Salo, Kauppila & Salminiitty 1998, 57). Niiden vaikutusmekanismi syntyy muun muassa antimikrobisten yhdisteiden sekä orgaanisten happojen (yleisimmät maito- ja etikkahappo) tuotosta. Jotkut kannat tuottavat haitallisten bakteerien kasvua estäviä yhdisteitä, mutta eivät vaikuta lähilajien, kuten esimerkiksi laktobasillien kasvuun. Jotkin ominaisuudet saattavat olla lisäksi isäntälaji-spesifisiä. (Palva, A. 2002, 601 – 605).

4.2 Kaupalliset probioottiviljelmät

Kaupalliset probioottiviljelmät ovat useimmiten konsentroidussa muodossa ja suurin osa niistä on DVS (direct vat set) -sovelluksia. DVS -viljelmät ovat yleisiä, koska probioottisen käyttöhapteen valmistamiseen ja hyödyntämiseen elintarviketuotannon olosuhteissa liittyy tiettyjä hankaluuksia. DVS-viljelmät toimitetaan joko jäädytettynä tai pakkaskuivattuina viljelminä. Kaupalliset probioottiviljelmät voivat koostua yhdestä tai useammasta maitohappobakteerikannasta. Viljelmät pakataan kaasua ja valoa läpäisemättömään materiaaliin, kuten alumiinifoliolla vuorattuihin kartonkitölkkeihin tai pusseihin ja niitä on käsiteltävä ja säilytettävä valmistajan ohjeiden mukaan. Pakastetut viljelmät sisältävät useimmiten $>10^{10}$ pmy/g ja pakkaskuivatut $>10^{11}$ pmy/g. Bakteeripitoisuudet (pmy/g) vaihtelevat käytetystä probioottikannasta riippuen. (Saarela, Mogensen, Fondén, Mättö & Mattila-Sandholm 2000, 205 – 206).

4.3 Käytettävien probioottikantojen vaatimukset ja valintaperusteet

Tärkeimpänä teknologisena vaatimuksena probiooteille on, että ne kestävät hengissä ruoansulatuskanavassa; suolistossa sekä happamassa mahalaukussa. Adheesio suolen limakalvoille on myös tärkeä ominaisuus, josta kaikki probiootit eivät ole adheesiivisiä. (Palva 2002, 604). Lisäksi Euroopan elintarvike- ja rehulainsäädäntö asettaa probiooteille teho- ja turvallisuusvaatimukset (EFSA 2009, 1439). Tietyiltä probioottikannoilta voidaan odottaa antagonistista vaikutusta eräitä patogeeneja kuten *Helicobacter pylori*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* ja *Clostridium difficile* -kantoja vastaan. Lisäksi joillakin probiooteilla on antimutageenisia ja antikarsinogeenisiä ominaisuuksia. (Mattila-Sandholm, Myllärinen, Crittenden, Mogensen, Fondén & Saarela 2002, 175).

Meijeriteolisuudessa probioottikannat valitaan näiden ominaisuuksien lisäksi muiden niiden teknologisten ominaisuuksien perusteella, joihin kuuluvat muun muassa aromiaineiden tuottaminen, hapontuoton nopeus sekä vaikutus lopputuotteen rakenteeseen. Probioottien on kestävä myös teollisen prosessoinnin kaikki vaiheet. (Palva 2002, 601 – 603). Lisäksi probiootteja sisältävän piimän valmistuksessa on lopputuotteen laadun kannalta tärkeätä, että konsentroidu probioottiviljelmä

1. Säilyy hyvin alhaisissa lämpötiloissa ja sen solupitoisuus on $>10^{10}$ pmy/g.
 2. Hapattaa ja saostaa maidon yksin tai apuhapatteen (startteri) kanssa ilman probioottikannan kasvun estymistä tai hidastumista.
 3. Tuottaa piimän, jossa probioottien määrä on valmistuksen jälkeen noin 10^8 pmy/g.
 4. Takaa korkean ja pysyvän probioottitason lopputuotteessa kolmen viikon kylmäsäilytyksen ajan.
 5. Tuottaa piimän, jossa säilyy riittävät aistinvaraiset ominaisuudet koko myyntiajan.
 6. Tuottaa piimän, jossa on stabiili rakenne ja sopiva viskositeetti.
- (Mattila-Sandholm ym. 2002, 176)

4.4 Probioottien käyttö yksin ja yhdessä apuhapatteen kanssa

Tutkimuksissa on pystytty osoittamaan, että sopivissa valmistusolosuhteissa jotkin probioottikannat pystyvät yksinään tuottamaan happoa hapannemistalvaimisteeseen. (Mattila-Sandholm ym. 2002, 176). Probiootteja käytettäessä yksinään hapattamaan maito on kuitenkin huomioitava, että monet probiootit saattavat olla kasvunopeudeltaan hitaita ja ne saattavat tuottaa sivumakua lopputuotteeseen. Tällaisista ongelmista selvittää osittain, kun käytössä on tarkka aseptinen valmistusprosessi ja prosessilaitteisto. Joissakin tapauksissa on mahdollista myös parantaa raaka-aineen soveltumista substraatiksi probiootin kasvuille lisäämällä siihen esimerkiksi glukosia energialähteeksi. (Saarela ym. 2000, 207).

Monissa tapauksissa on kuitenkin parempi käyttää probiootin lisäksi apuhapatetta hapannemistalvaimisteesen apuna. Molemmilla tavoilla on silti todettu olevan mahdollista valmistaa aistinvaraisesti hyviä tuotteita, joissa probiootit pystyvät säilymään riittävän elinkykyisinä. (Mattila-Sandholm ym. 2002, 176)

Negatiivista vuorovaikutustakin jossa apuhapate estää probiootin kasvua, voi ilmetä, mutta useimmille probiooteille löytyy sopiva apuhapate seulonnan avulla. Seulonnassa aistinvaraiset ominaisuudet ja probiootin eloonjäänti tutkitaan. Seulonnassa noudatetaan tiettyjä periaatteita:

1. Probiootin on syytä pystyä kasvamaan kypsytyksen aikana. Probioottien kokonaismäärä kasvaa piimän kypsytyksen aikana, jolloin tuotantokustannukset vähenevät. Lisäksi probioottien sopeutuminen hapannemistalvaimisteeseen paranee.

2. Useimmat probiootit kasvavat hyvin +37 °C:ssa, joten termofiilinen startteri on usein parempi kuin mesofiilinen
3. Apuhapatteen kasvunopeus on syytä olla maltillinen, jotta probiootti pääsisi kasvamaan paremmin
4. Probiootti ja apuhapate voidaan lisätä maitoon samaan aikaan. On myös huomioitava, että probiootin lisääminen piimään kypsytyksen ja sitä seuraavan jäädytyksen jälkeen ei jätä sijaa probiootin kasvuille, vaan se saattaa pikemminkin johtaa probiootin heikentyneeseen elinkykyyn. (Saarela ym. 2000, 207).

4.5 Probiootin elinkyisyys

Probioottista elintarviketta kehitettäessä elinkyisyys ja säilyvyys ovat avain tekijöitä sopivaa probioottikantaa valittaessa. Probiootin täytyy säilyä elinvoimaisena probioottivalmisteen tuottamisen jälkikäsittelyvaiheista, kuten sentrifugoinnista ja kuivaamisesta. Vaatimuksena on, että se kestää varastointia sekä säilyy elinkelpoisena mahalaikussa ja suolistossa tuotteen nauttimisen jälkeen. Probioottien määrää mikä tuottaa halutun terapeuttisen vaikutuksen ei tiedetä tarkalleen. Yleinen hyväksyttävä taso on kuitenkin enemmän kuin 10^6 elävää probioottista bakteeria per millilitra tai gramma tuotetta. (Lacroix & Yildirim 2007, 176). Uusimpien tutkimusten valossa päivittäinen probiootin saanti tulisi olla enemmän kuin 10^9 elävää pesäkeyksikköä (Ouweland, Salminen & Isolauri 2002, 279). Taulukossa 2 on esitetty probiootin elinkykyyn vaikuttavia tekijöitä probioottivalmisteen valmistusprosessista (fermentointi ja jälkikäsittely) elintarvikkeen varastointiin, päätyen mahalaikun kautta suolistoon.

Taulukko 2 Probioottien elinkykyyn vaikuttavat päätekijät (Lacroix & Yildirim 2007, 177)

1. Fermentointi	2. Jälkikäsittely	3. Varastointi	4. Vatsa ja suolisto
Kasvatusalustan koostumus	Mekaaninen rasitus	Kantajaelintarvikkeen happamuus	Vatsan happamat olosuhteet
Toksiset sivutuotteet (esim. orgaaninen happo, vetyperoksidi)	Pakastettavien tai kuivattavien alustojen koostumus	Hapekkaat olosuhteet	Entsyyminen aktiivisuus
Liennut happi	Äärimmäiset lämpötilaolosuhteet (spray-kuivaus tai pakka-kuivaus)	Kilpailu muiden organismien kanssa	Ympäristön koostumus (esim. käymiskykyiset sokerit)
Solupitoisuus fermentoinnin lopussa	Hapekkaat olosuhteet	Lämpötila	Ohutsuolen sappisuolat
	Solun kuivuminen	Kosteuspitoisuus	

4.6 Prebiootit

Prebiootit luokitellaan ei-eläviksi, ruoansulatuksessa sulamattomaksi ainesosiksi, jotka riittävästi nautittuna stimuloivat selektiivisesti yhden tai useamman mikrobikannan kasvua ja aktiivisuutta suolessa tuottaen tiedetyn terveyshyödyn (Varzakas & Ioannas 2010, 200) Probiootin ja prebiootin yhteiskäytöllä voi näin olla symbioottinen vaikutus, jossa prebiootti stimuloi probiootin sekä mahdollisesti startterin kasvua ja aktiivisuutta. Prebiootteja ovat esimerkiksi laktuloosi ja galakto- ja frukto-oligosakkaridit sekä resistentti tärkkelys (Saarela ym. 2000, 208).

5 TESTIPIIMIEN VALMISTUS, LAADUNVALVONTA JA SÄILYVYYDEN SEURANTA

5.1 Työn tarkoitus

Tutkimuksen aikana valmistettiin viisi koostumukseltaan erilaista piimää. Piimien valmistuksessa käytettiin homogenoimatonta pastöroitua raakamaitoa, kolmea eri probioottikantaa (VET9A, VET14A ja VET16A), joita esikasvatettiin pienessä määrässä autoklavoitua maitoa sekä kaupallista DL-piimähapatetta. Verrokkituotteeksi valmistettiin piimä (tuote P5), jossa maitoon lisättiin ainoastaan perinteistä kaupallista DL –piimähapatetta. Tuotteet P2a ja P2b siirrostettiin pakasteypillä suoraan piimämaitoon. Lisäksi prebiootin lisäämistä testattiin kahden tuotteen valmistuksessa. Valmistetut piimät pakattiin 2 dl:n alumiinikannellisiin pikareihin ja niitä säilytettiin kylmiössä kolmen viikon ajan. Kolmen viikon aikana piimien ominaisuuksia ja säilyvyyttä tutkittiin aistinvaraisesti, kemiallisesti ja mikrobiologisesti kerran viikossa. Testituotteiden valmistus, tarkemmat koostumukset ja ominaisuudet sekä valmiiden piimien analysointitulokset kerrotaan edempänä.

5.2 Materiaalit ja menetelmät

5.2.1 Bakteerikannat

Neljään testipiimään (P1 – P4) lisättiin kolmea eri probioottikantaa (VET9A, VET14A sekä VET16A). Tuotteissa P3 ja P4 käytettiin apuhapatteena kaupallista DL-hapatetta (Bulk Set HM-505 LYO, Danisco Ltd.), joka sisälsi kannat *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* ja *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Verrokki tuotteen P5 hapattamiseen käytettiin ainoastaan edellä mainittua kaupallista hapatetta. Lisäksi tuotteissa P2a ja P2b sekä P4 kokeiltiin prebioottilisäystä.

5.2.2 Raakamaito

Eri koostumuksen omaavia piimiä valmistettiin viisi erää. Kaikkien piimien (testituotteet P1 – P5) valmistuksessa käytettiin homogenoimatonta raakamaitoa. Raakamaidon rasvapitoisuus vaihteli tuotteesta riippuen 4,11 ja 4,34 % välillä.

5.2.3 Testipiimien koostumus

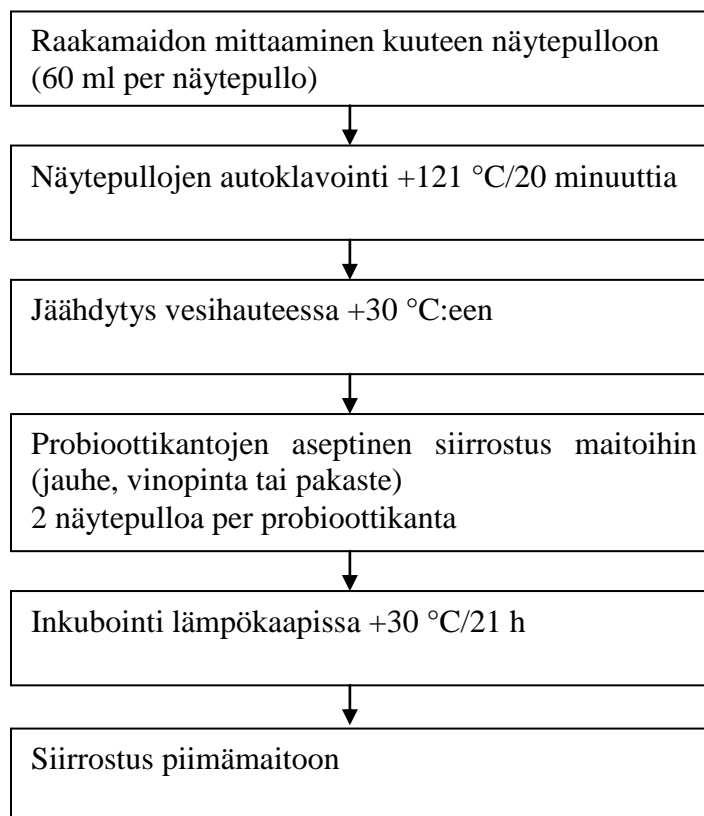
Taulukossa 3 on esitetty kunkin tuotteen koostumus, siirrostustapa sekä valmistusajankohta. Kaikki tuotteet kypsytettiin inkubointikaapissa +22 °C/18 – 20 tuntia.

Taulukko 3 Testipiimien koostumus

Tuote	Valmistuspäivä	Koostumus	Siirrostustapa
P1	06.04.2010	Raakamaito, rasvapitoisuus 4,22 % VET9A VET14A VET16A	vinopinta vinopinta vinopinta
P2a	28.04.2010	Raakamaito, rasvapitoisuus 4,34 % VET9A VET14A VET16A Prebioottilisäys 1,5 %	vinopinta vinopinta vinopinta
P2b	04.05.2010	Raakamaito, rasvapitoisuus 4,11% VET9A VET14A VET16A Prebioottilisäys 1,5 %	pakaste (ei esikasvatusta) pakaste (ei esikasvatusta) pakaste (ei esikasvatusta)
P3	16.03.2010	Raakamaito rasvapitoisuus 4,19 % VET9A VET14A VET16A Kaupallinen piimähapate	jauhe jauhe jauhe
P4	30.03.2010	Raakamaito rasvapitoisuus 4,21 % VET9A VET14A VET16A Kaupallinen piimähapate Prebioottilisäys 1,5 %	vinopinta jauhe vinopinta
P5	09.03.10	Raakamaito, rasvapitoisuus 4,20 % Kaupallinen piimähapate	DVS -rae

5.2.4 Probioottien esikasvatus

Piimien siirrostusta varten kolmea tutkittavaa probioottikantaa (VET9A, VET14A, VET16A) esikasvatettiin kutakin kahdessa 100 ml näytepullossa. Kaikkiin kuuteen näytepulloon mitattiin 60 ml raakamaitoa, jonka jälkeen maidot steriloidtiin autoklaavissa $+121\text{ }^{\circ}\text{C}/20\text{ min}$. Autoklavoinnin jälkeen näytepullot jäähdytettiin vesihauteessa siirrostuslämpötilaan $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$:een. Probiootit toimitettiin erilaisina formulointeina. Siirrostukseen käytettiin tuotteesta riippuen probioottijauhetta ($0,5\text{ g}/60\text{ ml}$ raakamaitoa), probioottikasvustoa siirrostettiin autoklavoituun raakamaitoon siirrostusilmukalla vinopinnalta (slantti) tai maitoon kaavittiin sulatettua probioottikantaa pakasteputkilosta. Kaikki probioottisiirrostet kasvatettiin inkubointikaapissa, $+30\text{ }^{\circ}\text{C}/21\text{ h}$. Esikasvatuksen jälkeen siirrostesta otettiin yhteensä 10 ml näytettä maitohappobakteerien määrän selvittämiseksi mikrobiologisesti. Osa näytteestä (noin 5 ml) käytettiin pH arvon mittaamiseen. Loput 50 ml kutakin probioottisiirrostetta käytettiin piimän valmistuksessa piimämaidon saostamiseen. Probioottikantojen esikasvatus on esitetty kuviossa 2.

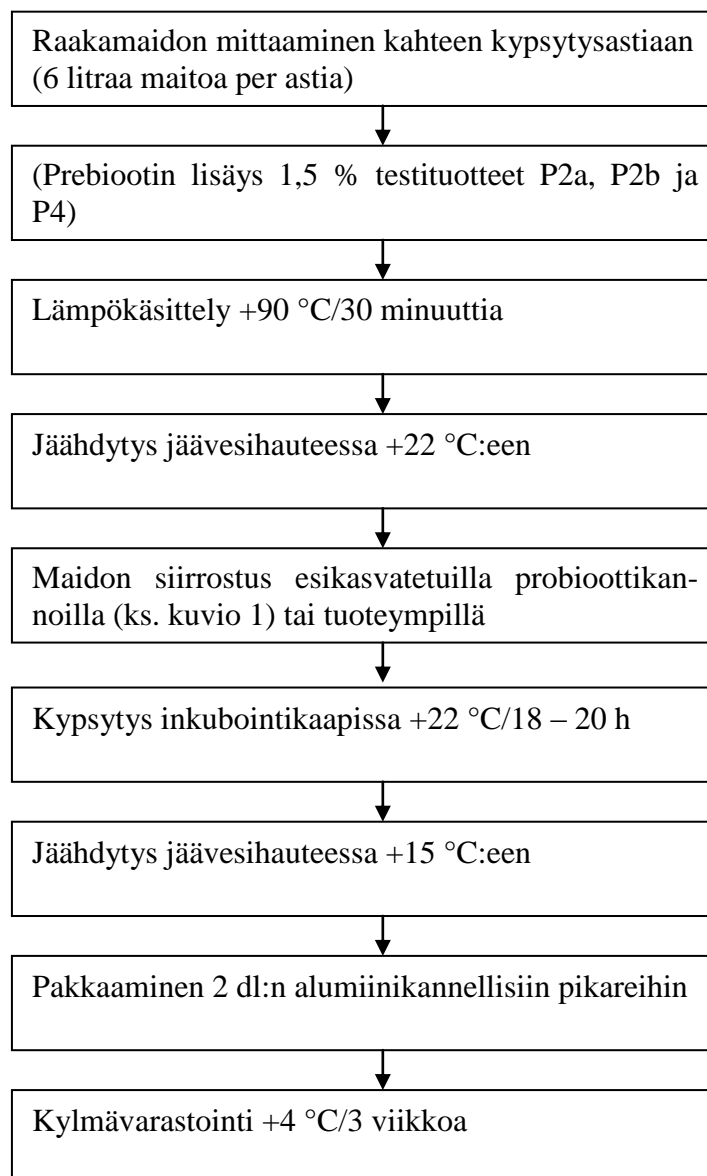


Kuvio 2 Vuokaavio, probioottikantojen esikasvatus näytepulloissa

5.2.5 Testituotteiden valmistus, pakkaus ja varastointi

Kutakin piimäerää valmistettiin yhteensä 12 litraa kahdessa 10 litran hapateastiassa, joihin mitattiin 6 litraa maitoa. Maidot lämpökäsiteltiin vesihauhteessa (kuva 1) $+90\text{ }^{\circ}\text{C}/30$ minuuttia, jonka jälkeen ne jäähdytettiin jäävesihauteessa siirrostus- ja kypsytyslämpötilaan $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Maidot siirrostet-

tiin kolmella esikasvatetulla probiootikannalla (VET9A, VET14A ja VET16A). Testituotteisiin P2a ja P2b sekä P4 lisättiin 1,5 % prebioottijauhetta. Lisäksi testituotteiden P2a ja P2b valmistuksessa ei käytetty esikasvatettua maitoa, vaan tuotteet siirrostettiin suoraan piimämaitoon pakasteympistä. Verrokipiimässä (testituote P5) käytettiin raakamaidon lisäksi ainoastaan kaupallista DL-hapatetta (Bulk Set HM-505 LYO, Danisco Ltd.) ilman probioottilisäystä. Hapate oli jauheen muodossa ja se ympätettiin niin ikään suoraan piimämaitoon. Siirrostuksen jälkeen piimämaidot kypsytettiin +22 °C:ssa lämpökaapissa 18 – 20 tuntia, jonka jälkeen tarkistettiin piimien saostuman laatu ja mitattiin pH. Tämän jälkeen piimät sekoitettiin ja jäähdytettiin jäävesihauteessa +15 °C:een, jolloin piimien happaneminen käytännössä pysähtyy, eikä jälkihappanemista pääse tapahtumaan. Piimät pakattiin pakkauskoneella (kuva 2) 2 dl:n alumiinikansilla varustettuihin pikareihin ja pikarit siirrettiin kylmäsäilytykseen +4 °C:een kolmeksi viikoksi. Tuotteen säilyvyyttä analysoitiin aistinvaraisesti ja mikrobiologisesti kerran viikossa. Kylmiön lämpötilaa seurattiin loggerin avulla. Alla on esitetty vuokaavio (kuvio 3) testipiimien valmistuksesta.



Kuvio 3 Vuokaavio, testipiimien valmistus



Kuva 1 Vesihaude piimämaidon lämpökäsittelyä varten



Kuva 2 Piimäpikarien kansituskone

5.2.6 Mikrobiologiset määritykset

Ennen tuotteiden valmistusta lämpökäsitellystä maidosta tehtiin maljavalut kokonaisbakteerien määrittämiseksi. Määritys tehtiin PCA + maitojauhe -alustalla (LabM, Evira 3420/1, 2006). Valmiista tuotteista määritettiin:

- Enterobakteerit VRBG -alustalla (Scharlau Microbiology, Espanja ISO 21528-2:2004)

- Hiivat ja homeet YGC -alustalla (Merck, Saksa, ISO 6611|IDF 94:2004)
- Kontaminantit sokerittomalla SF -alustalla (Merck, Saksa, ISO 13559/2002)
- Maitohappobakteerit modifioidulla LBS -alustalla ilman etikka-happolisää (Becton Dickinson, MD, USA, ISO 4833:2003). Määritettiin myös esikasvatusmaitoista.

5.2.7 Aistinvaraiset analyysit ja pH mittaus

Tuotteille suoritettiin aistinvarainen arviointi, jossa piimistä tutkittiin haju, rakenne ja ulkonäkö. Piimät pisteytettiin asteikolla 1 – 5. Arviointi suoritettiin heti tuotteen kypsytyksen ja pakkauksen jälkeen, ja sen jälkeen piimät arvioitiin kerran viikossa kolmen viikon aikana. Aistinvarainen arviointi suoritettiin Eviran menetelmäohjeen mukaisesti (Evira 8005/1, 2006). Arviointiraatiin kuului vähintään kaksi arvioijaa.

Piimien pH tutkittiin niin ikään pakkauksen jälkeen sekä kolmen viikon varastoinnin aikana kerran viikossa. pH-mittari (Metrohm 827 pH lab, Sveitsi) tarkistettiin ja kalibroitiin tarvittaessa ennen mittauksia.

6 TULOKSET JA TULOSTEN ARVIOINTI

6.1 Testipiimien aistinvarainen laatu ja happamuus

Testipiimien aistinvaraiset ominaisuudet olivat hyvät, eivätkä ne juurikaan muuttuneet kolmen viikon kylmäsäilytyksen aikana. Prebioottisäyksestä päätettiin kuitenkin luopua, koska piimämaitoihin ennen pastörointia lisätty prebioottijauhe ei liennut maitoon tuotteissa P2a, P2b ja P4 (syntyi kokkareita jonka seurauksena rakenne sekä haju ja maku heikentyivät hieman). Tuotteita P2a ja P2b ei arvioitu tarkemmin aistinvaraisesti eikä pH:ta mitattu, koska piimämaidot eivät saostuneet probioottien puutteellisen aktiivisuuden takia. Lisäksi tutkimuksen aikana havaittiin, että testipiimässä P3 oli runsaasti enterobakteereja kontaminoituneen probioottierän takia. Kontaminaatio vaikutti valmistettavien tuotteiden aistinvaraiseen arviointiin siten, että makua ei analysoitu infektioriskistä johtuen. Myös tuotteiden P1 ja P4 havaittiin olevan kontaminoituneita. Taulukossa 4 on esitetty tuotteiden valmistuspäivät, aistinvaraisten arviointien tulokset sekä pH arvot. Taulukon perusteella voidaan todeta, että aistinvaraisesti tarkasteltuna testipiimät säilyivät käyttökelpoisena noin kolmen viikon ajan ulkonäön, rakenteen ja hajun suhteen. Myös pH arvot pysyivät tasaisina kylmäsäilytyksen aikana.

Taulukko 4 Testipiimien aistinvaraisten arviointien tulokset ja pH

Tuote	Päiväys	Ulkonäkö 1 – 5	Rakenne 1 – 5	Haju 1 – 5	pH
P1	08.04.10	5	3,5	3,5	4,7
	15.04.10	5	3,5	4	4,62
	22.04.10	3	3,5	4	4,6
	29.04.10	-	-	-	-
P2a	28.04.10	1	1	1	-
P2b	04.05.10	1	1	1	-
P3	17.03.10	5	4	5	4,58
	24.03.10	5	3,5	5	4,64
	31.03.10	5	3,5	5	4,64
	08.04.10	5	3,5	4,5	4,62
P4	31.03.10	5	3,5	4	4,54
	08.04.10	5	3	4	4,55
	15.04.10	5	3	4	4,54
	22.04.10	3	4	3,5	4,56

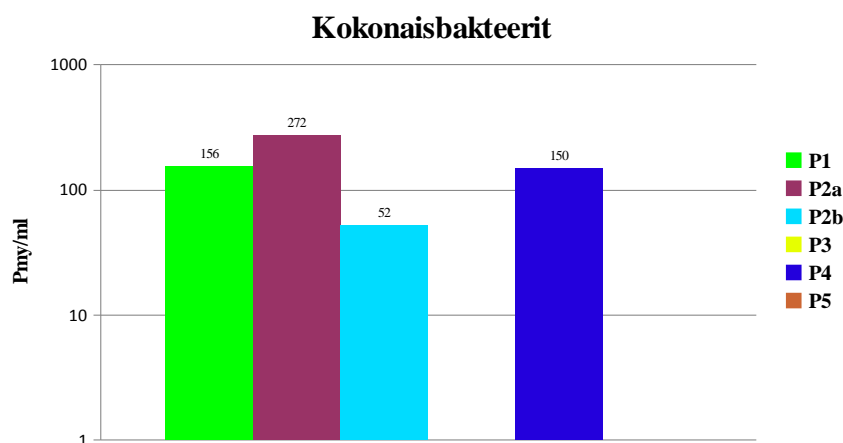
P5	10.03.10	5	4	5	4,57
	17.03.10	5	5	5	4,56
	24.03.10	5	3,5	3	4,59
	31.03.10	5	3	5	4,51

6.2 Testipiimien mikrobiologinen laatu

Kunkin testipiimän mikrobiologiset määrittystulokset kolmen viikon säilytysajalta on esitetty taulukkomuodossa liitteissä 2 – 7.

6.2.1 Kokonaisbakteeripitoisuudet lämpökäsitellystä maidosta (PCA)

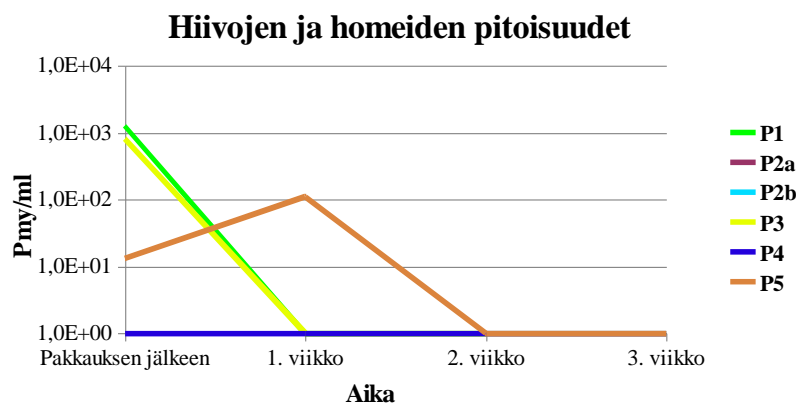
Ei-selektiivisellä PCA –alustalla oli hieman kasvustoa (todennäköisesti lämpökäsittelyn kestäviä bakteeri-itiöitä) kaikilla tutkituista piimämaidoista (P1, P4 sekä P2a ja P2b) lämpökäsittelyn jälkeen. Maito lämpökäsiteltiin tyypillisellä lämpötila/aika –yhdistelmällä +90 °C/30 minuuttia. Kuviossa 4 on esitetty kokonaisbakteerimäärät piimämaidojen pastöroinnin jälkeen.



Kuvio 4 Kokonaisbakteerimäärät piimämaidoissa pastöroinnin jälkeen (Ei-selektiivinen PCA alusta)

6.2.2 Hiivat ja homeet (YGC)

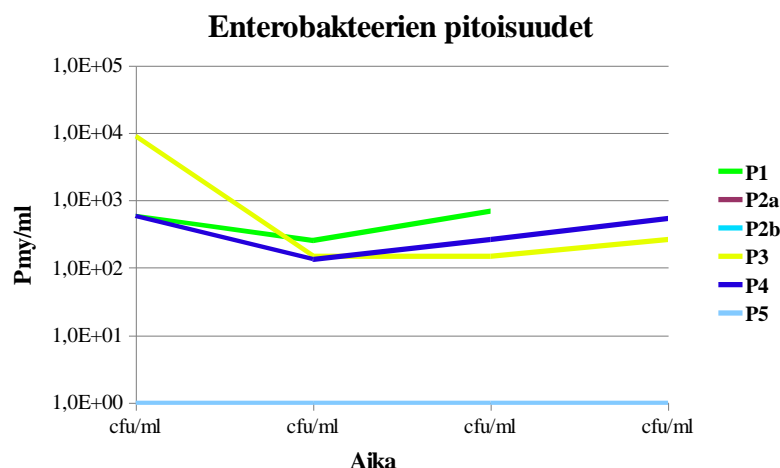
YGC –alustalla havaittiin kasvustoa (kuvio 5). Esimerkiksi tuotteissa P1 ja P3 havaittiin hiivoja ja homeita pakkauksen jälkeen, mutta viikon päästä kasvustoa ei mikrobiologisissa määrittelyissä todettu. Myös tuotteessa P5 havaittiin hiiva- ja homepesäkkeitä vielä yhden viikon kylmäsäilytyksen jälkeen, mutta ei enää toisella viikolla.



Kuvio 5 Hiivojen ja homeiden määrät testipiimissä (YGC alusta)

6.2.3 Enterobakteerit (VRBG)

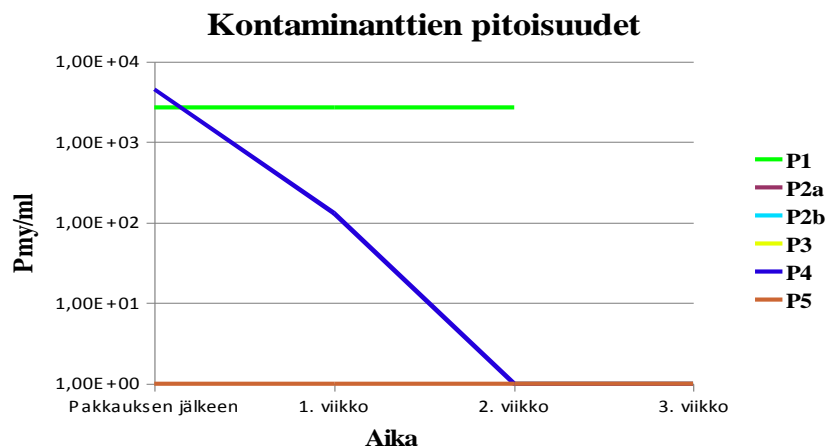
Enterobakteerit määritettiin VRBG –alustalla. Testipiimissä P1, P3 ja P4 havaittiin enterobakteerikontaminaatio, joka näkyy kuviossa 6.



Kuvio 6 Enterobakteerien määrät testipiimissä (VRBG alusta)

6.2.4 Kontaminantit (SF)

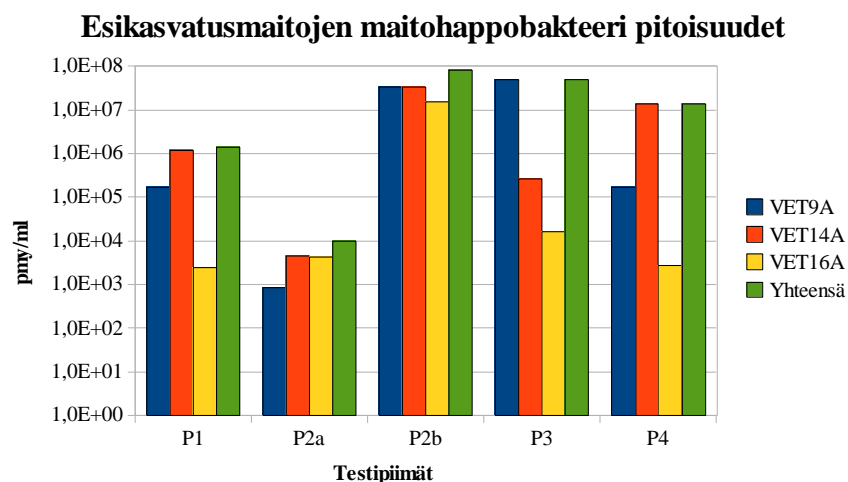
Sokerittomalla ei-selektiivisellä SF –alustalla tutkittiin kontaminanttien määrää. Alustalla muodostui pieniä neulankärki pesäkkeitä, joiden todettiin gramvärjäämällä ja mikroskopoimalla olevan todennäköisesti maitohappobakteereja sekä isompia pesäkkeitä. Isommat pesäkkeet olivat mahdollisia kontaminantteja tai yhteen kasvaneita neulankärki pesäkkeitä. SF –alustan käyttö ei antanut yksiselitteistä tulosta ja se päätettiin jättää tulevista analysoinneista pois. Kuviossa 7 on esitetty neulankärkipesäkkeitä isompien pesäkkeiden määrät.



Kuvio 7 Kontaminanttien määrät testipiimissä (ei-selektiivinen sokeriton alusta)

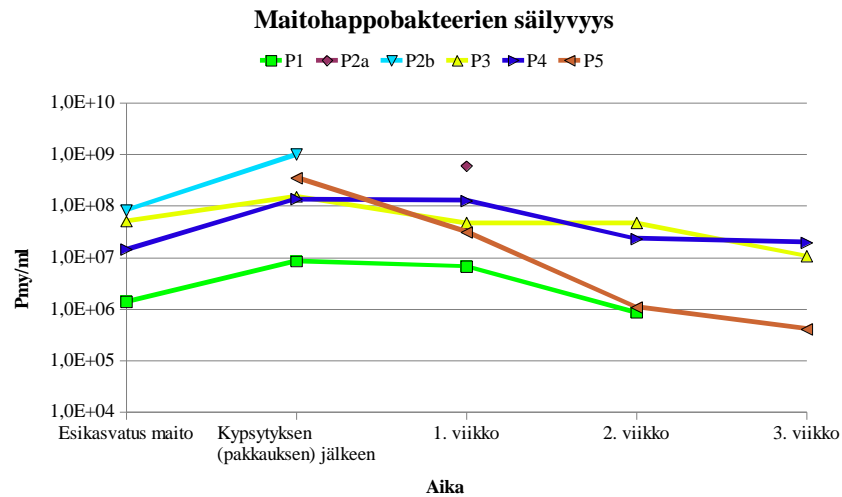
6.3 Testituotteiden säilyvyys

Kuviossa 8 on esitetty esikasvatusmaitojen probioottipitoisuudet. Määrittelytulokset ovat taulukkomuodossa liitteessä 1.



Kuvio 8 Esikasvatusmaitojen probioottipitoisuudet

Vertaamalla esikasvatusmaitojen (kuvio 8) kokonaismaitohappobakteerituloksia valmiiden tuotteiden maitohappobakteeripitoisuuksiin (kuvio 9) huomataan, että kaikki tai vähintään yksi kolmesta probioottiympistä pystyi kasvamaan piimässä. Probioottien määrät olivat lisäksi hyväksyttävällä tasolla vielä kolmen viikon kylmävarastoinnin lopussa lukuun ottamatta tuotetta P1, joka jäi hieman alle 10^6 pmy/ml kahden viikon varastoinnin jälkeen (sekä verrokkituote P5 reilun kahden viikon jälkeen). Kuviossa 8 on esitetty valmiiden tuotteiden maitohappobakteerien kehitys esikasvatuksen, valmistuksen ja kylmävarastoinnin jälkeen. Testituotteiden P2a ja P2b mikrobiologiset määritykset jätettiin puutteellisiksi, koska tuotteet eivät saostuneet odotetusti eivätkä täyttäneet näin ollen tyypillisen piimän aistinvaraisia ominaisuuksia.



Kuvio 9 Testipiimien maitohappobakteerien määritystulokset

6.4 Pohdinta

Aistinvaraisilta ominaisuuksiltaan parhaaksi tuotteeksi osoittautui testipiimä P3, jonka valmistuksessa oli käytetty kolmen probioottikannan lisäksi kaupallista hapatetta. Huonona puolena käytettäessä kaupallista hapatetta osana probioottisen piimän valmistusta on, että probioottien osuutta piimässä ei pystytä selvittämään kokonaismaitohappobakteeri määrästä tämän tutkimuksen puitteissa. Pahimmassa tapauksessa apuhapatteena käytetty kaupallinen hapate on saattanut estää probioottien kasvua ja parhaimmillaan se on saattanut edistää sitä. Jatkokehitystä varten valittiinkin tuote P2b, jonka valmistuksessa käytettiin kolmea probioottikantaa (sekä probioottijauhetta, jonka lisäksi luovuttiin, koska se heikensi aistinvaraisia ominaisuuksia). Testipiimän P2b hyviä puolia ovat helppo siirrostustapa (ymppäys probioottipakasteella) ja lyhyt kokonaisvalmistusaika, koska esikasvatusta ei tarvita. Testipiimä ei saostunut tässä tutkimuksessa käytetyillä kypsytyksparametreilla (+22 °C/18 – 20 h), jonka takia kokeiltiin kypsytyslämpötilan nostoa +37 °C:een kypsytyksajan pysyessä 18 – 20 tunnissa. Kypsytyksparametrien muutoksen jälkeisiä mikrobiologisia ja aistinvaraisia analyysituloksia ei esitetä tässä opinnäytetyössä.

LÄHTEET

- Ahonen, A-M. 2007. Meijerin mikrobiologiaa. Teoksessa Aho J. & Hildén T. (toim.) Maidon matkassa. Helsinki: Opetushallitus, Edita prima Oy, 45–62.
- Anon 2009. Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. EFSA Journal 2009, 7 (12) 1431 – 1523.
- Arla Ingman. 2010. Maidot/Piimät. Viitattu 20.5.2010.
<http://www.arlaingman.fi/tuotteet/maidotpiimat/piima/arla-ingman-rasvaton-piima-rela/>
- Bylund, G. 2003. Dairy Processing Handbook. Lund, Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB, 255–277
- Evira 2006. Maitovalmisteiden aistinvarainen laadunarviointi pisteyttämällä. OSA VII – Suositus hapatettujen maitovalmisteiden aistinvaraisen laadunarvioinnin menetelmäksi. Evira 8005/1.
- Evira 2008. Enterobakteerien määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka. 3462/3.
- Evira 2006. Mikrobien lukumäärän määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka. 3420/1.
- Fondén, R., Leporanta, K. & Svensson, U. 2006. Nordic/Scandinavian Fermented Milk Products. Teoksessa Tamime, A. Y (toim.) Fermented Milks. Society of Dairy Technology. Blackwell Science Ltd, a Blackwell publishing company, 156–173.
- ISO/IDF 2002. Butter, fermented milks and fresh cheese - Enumeration of contaminating microorganisms. 13559/IDF 153: 2002.
- Lacroix, C. & Yildirim, S. 2007. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. Teoksessa Current Opinion in Biotechnology 18. Elsevier Ltd. 176 – 183
- Milk works n.d. Levylämmönvaihtimen toiminta. Viitattu 30.5.2010.
http://portal.hamk.fi/portal/page/portal/HAMI/Milkworks/Oppimateriaali/kasittely_meijerissa/pastorointi/levylammonvaihtimen_toiminta
- Manninen, R. 2008, Hapanmaitovalmisteet –opintojakson luentoaineisto. Hämeen ammattikorkeakoulu 25.9.2008

Manninen, R. 2005. Maito ja maitovalmisteet. Teoksessa Saarela, A-M., Hyvönen, P., Määttä, S. & von Wright, A. (toim.) Elintarvikeprosessit. Tampere: Tampereen Yliopistopaino Oy Juvenes Print, 23–38.

Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R. & Saarela, M. 2002 Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* 12, 174 – 182

Evira 2007. Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten. Eviran toimintaohje MIBI 028/1 2007.

Nilsson, L.-E., Lyck, S. & Tamime, A.Y. 2006. Production of Drinking Products. Teoksessa Tamime, A. Y. (toim.) *Fermented Milks*. Society of Dairy Technology. Blackwell Science Ltd, a Blackwell publishing company, 95–127.

Palva, A. 2002. Maitohappobakteerien mikrobiologiaa. Teoksessa Salakinoja-Salonen (toim.) *Mikrobiologian perusteita*. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy, 593 – 691.

Evira 2006. Mikrobien lukumäärän määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka. Evira 3420/1, 2006.

Robinson, R.K. & Tamime, A.Y. 2006. Types of Fermented Milks. Teoksessa Tamime, A. Y. (toim.) *Fermented Milks*. Society of Dairy Technology. Blackwell Science Ltd, a Blackwell publishing company, 1 – 10.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. & Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84, 197 – 215.

Salo A., Kauppila J. & Salminiitty J. 1998. Elintarviketeollisuuden teknologiset menestystekijät. Liite 1 Teknologioiden kehitysnäkymiä. Tekes. Paino-Center Oy, Sipoo, 49 – 67

Silfverberg, P. 2007. Valmistusprosessien perusvaiheet. Teoksessa Johanna Aho & Tiina Hildén (toim.) *Maidon matkassa*. Helsinki: Opetushallitus, Edita prima Oy, 105–113.

Matilda maataloustilastot. 2009. Rasvaton maito edelleen suosiossa. Viitattu 14.9.2010. <http://www.maataloustilastot.fi/suomalaisten-lihan-kulutus-kasvoi-siipikarjanlihan-kulutus-ohitti-ensimmaista-kerta-naudanlihan-kul>

Ouwehand AC., Salminen S. & Isolauri E. 2002. Probiotics: An overview of beneficial effects. *Ant van Leeuw* 82 (1 – 4), 279 – 289.

Valio Oy, 2010. Tuotteet ja uutuudet. Piimät. Viitattu 20.5.2010. http://www.valio.fi/portal/page/portal/Valio/Tuotteet_ja_Uutuudet/Tuoteryhma?t_rhyma=PIIMAT&tuory=9

Varzakas, T. H. & Ioannas, S. A. 2010. Functional Bioactive Dairy Ingredients. Teoksessa Yildiz F. (toim.) Development and Manufacture of Yoghurt and Other Functional Dairy Products. Taylor & Francis Group, LLC, 197 – 228.

Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A. & van Boekel, M. A. J. S. (toim.) 1999. Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes. New York: Marcel Dekker Inc., 517–537

ESIKASVATUSMAITOJEN PROBIOOTTIPITOISUUDET

	VET9A	VET14A	VET16A	Yhteensä
P1	1,2E+06	1,7E+05	2,4E+03	1,4E+06
P2a	4,6E+03	8,3E+02	4,3E+03	9,7E+03
P2b	3,3E+07	3,3E+07	1,5E+07	8,1E+07
P3	2,7E+05	5,0E+07	1,6E+04	5,0E+07
P4	1,4E+07	1,7E+05	2,8E+03	1,4E+07

TESTITUOTTEEN P1 MIKROBIOLOGISET MÄÄRITYSTULOKSET

P1

Vuorokautta tuotteen valmistuksesta	Kasvatusalusta	Tulos (pmy/ml)	Huomioitavaa
07.04.2010	PCA+milk	1,56E+02	Maito pastöroinnin jälkeen, ennen siirrostusta
1	VRBG	590	
2	LBS	8,48E+06	
5	YGC	1,29E+03	
3	SF	2,700E+03	Isoja pesäkkeitä
8	VRBG	250	
9	LBS	6,70E+06	
12	YGC	<1	
10	SF	2,70E+03	Isoja pesäkkeitä
15	VRBG	685	
16	LBS	8,70E+05	
19	YGC	<1	
17	SF	2700	Isoja pesäkkeitä

TESTITUOTTEEN P2a MIKROBIOLOGISET MÄÄRITYSTULOKSET

P2a

Vuorokautta tuotteen valmistuksesta	Kasvatusalusta	Tulos (pmy/ml)	Huomioitavaa
1. versio, siirrostus vinopinnalta (1 viikon jälkeen)			
28.04.2010	PCA	>272	Kukkamaisia pesäkkeitä
8	VRBG	<1	
9	LBS	5,90E+08	
12	YGC	<1	
10	SF	4,15E+03	Keskikokoisia pesäkkeitä

TESTITUOTTEEN P2b MIKROBIOLOGISET MÄÄRITYSTULOKSET

P2b

1. versio, siirrostus pakasteesta (pakkauksen jälkeen)			
04.05.10	PCA	52	Kukkamaisia ja muunlaisia pesäkkeitä
1	VRBG	<1	
2	LBS	9,86E+08	
5	YGC	<1	
3	SF	<1	Isoja pesäkkeitä

TESTITUOTTEEN P3 MIKROBIOLOGISET MÄÄRITYSTULOKSET

P3

Vuorokautta tuotteen valmistuksesta	Kasvatusalusta	Tulos (pmy/ml)	Huomioitavaa
1	VRBG	9,0E+03	
2	LBS	1,5E+08	
5	YGC	8,2E+02	Jälkikontaminaatio?
3	SF	9,0E+03	Neulanpää pesäkkeet
3	SF	2,7E+03	Isot pesäkkeet
8	VRBG	150	
9	LBS	4,7E+07	
12	YGC	<1	
10	SF	1,1E+06	Neulanpää pesäkkeet
10	SF	-	Isot pesäkkeet
15	VRBG	1,5E+02	
16	LBS	4,7E+07	
19	YGC	<1	
17	SF	1,1E+06	Neulanpää pesäkkeet
17	SF	<1	Isot pesäkkeet
22	VRBG	260	
23	LBS	1,1E+07	
26	YGC	<1	
24	SF	9,0E+03	Neulanpää pesäkkeet
24	SF	<1	Isot pesäkkeet

TESTITUOTTEEN P4 MIKROBIOLOGISET MÄÄRITYSTULOKSET

P4

Vuorokautta tuotteen valmistuksesta	Kasvatusalusta	Tulos (pmy/ml)	Huomioitavaa
30.03.2010	PCA (pastöroitu piimämaito)	>150	Kukkamaisia pesäkkeitä
1	VRBG	590	
2	LBS	1,4E+08	
5	YGC	<1	
3	SF	4,5E+03	Isoja pesäkkeitä
8	VRBG	135	
9	LBS	1,3E+08	
12	YGC	<1	
10	SF	1,3E+02	Isoja pesäkkeitä
15	VRBG	265	
16	LBS	2,3E+07	
19	YGC	<1	
17	SF	<1	Isoja pesäkkeitä
22	VRBG	535	
23	LBS	2,00E+07	
26	YGC	<1	
24	SF	<1	Isoja pesäkkeitä

TESTITUOTTEEN P5 MIKROBIOLOGISET MÄÄRITYSTULOKSET

P5

Vuorokautta tuotteen valmistuksesta	Kasvatusalusta	Tulos (pmy/ml)	Huomioitavaa
1	VRBG	< 1	
2	LBS	3,5E+08	
5	YGC	1,3E+01	
3	SF	<1	Isot pesäkkeet
	MRS	-	
8	VRBG	< 1	
9	LBS	3,1E+07	
12	YGC	1,1E+02	
10	SF	<1	Isot pesäkkeet
15	VRBG	<1	
16	LBS	1,1E+06	
19	YGC	<1	
17	SF	<1	Isot pesäkkeet
22	VRBG	<1	
23	LBS	4,1E+05	
26	YGC	<1	
24	SF	<1	Isot pesäkkeet